

**ÜBER DIE WIRKUNG NIEDERMOLEKULARER
PEPTIDFAKTOREN VON KÄLBERMILZ UND
KÄLBERSERUM AUF DAS PERIPHERE
BLUTBILD VON N M R I - MÄUSEN**

Wilfried Helmut Schürenberg

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0069

Lehrstuhl für Innere Medizin, spez. Hämatologie der
Universität München
(Prof. W. Stich)

ÜBER DIE WIRKUNG NIEDERMOLEKULARER PEPTIDFAKTOREN
VON KÄLBERMILZ UND KÄLBERSERUM AUF DAS PERIPHERE
BLUTBILD VON N M R I - MÄUSEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Medizin

verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

W i l f r i e d S c h ü r e n b e r g
aus Nürnberg

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Stich
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 1. 1974



Gewidmet

meiner lieben Frau

INHALTSVERZEICHNIS

=====

- I. Einleitung und Fragestellung
- II. Material und Methodik
 - 1. Präparation der Extrakte
 - 2. Gelchromatographie
 - 3. Tierversuche
 - 4. Inaktivierungsversuche
- III. Ergebnisse
 - 1. Ergebnisse der Säulentrennung
 - 2. Wirkungen der Milzfraktionen und Serumfraktionen
 - 3. Inaktivierungsversuche
- IV. Diskussion
- V. Zusammenfassung
 - Summary
- VI. Schrifttumsverzeichnis

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Bedeutung der Milz ist im Laufe der Jahrhunderte unterschiedlich beurteilt worden. Die seit dem Altertum bekannte Tatsache, daß der Mensch auch ohne Milz leben kann, hat schon die Ärzte der Antike wie etwa Erasistratos dazu bewogen, sie als ein Organ ohne Funktion oder gar als überflüssig anzusehen. Zahlreiche klinische und experimentelle Beobachtungen der letzten Jahrzehnte verhalfen diesem jetzt viel diskutierten Organ zu neuen Ehren. Vor allem das rätselhafte Syndrom des Hypersplenismus rückte das vergessene Organ wieder in den Mittelpunkt des Interesses. Dieser Begriff Hypersplenismus wurde vor 60 Jahren von CHAUFFARD geprägt und hat sich bis heute gehalten. Nach allgemein anerkannter Auffassung versteht man heute unter dem Syndrom des Hypersplenismus (10, 26, 9) ein Krankheitsbild, das klinisch gekennzeichnet ist durch:

- 1) Periphere Cytopenie (Verminderung aller cellulären Bestandteile des Blutes mit wechselndem Vorrang der einzelnen Zellelemente).
- 2) Aktives, hyperplastisches Knochenmark
- 3) Splenomegalie
- 4) Normalisierung des Blutbildes nach Splenektomie

Für die Entstehung der verschiedenen Arten des Hypersplenismus (Thrombocytopenie, Anämie, Neutropenie, Pancytopenie) werden im wesentlichen zwei pathogenetische Mechanismen diskutiert:

- 1) Die Hypothese, daß die vergrößerte Milz eine verstärkte Sequestration von Blutzellen bewirkt und daraus eine gesteigerte Zerstörung erfolgt. (21, 32)
- 2) Die Milz verfüge über einen humoralen Mechanismus zur Hemmung der Reifung oder Freisetzung von Knochenmarkszellen. (9, 12, 15)

Viele experimentelle und klinische Befunde, vor allem die mit Isotopenmethoden gewonnenen Ergebnisse, scheinen für die erste Annahme zu sprechen. (BLEIFELDT, GROSS und MITARBEITER, WEINREICH) Allerdings läßt sich mit dieser Vorstellung z.B. nicht erklären, daß beim Syndrom der splenomegalen Markhemmung unmittelbar nach der Splenektomie sehr rasch eine Normalisierung der Knochenmarkstätigkeit und des peripheren Blutbildes eintritt. Es ist anzunehmen, daß beide Theorien einander nicht ausschließen, sondern sich vielmehr ergänzen. Die Befunde der Leukozyten im peripheren Blut nach Splenektomie sind im Tierversuch und am Menschen ziemlich einheitlich. (HEILMEYER - 13 -, STREICHER - 31 -) Nach Herausnahme der Milz tritt eine starke Leukozytose ein, die bis zu 100 % beträgt und die gewöhnlich einige Wochen bis Monate anhält. (E. und D. TROLLE, LATTEN, KRUMBHAAR, KAMERLING, PALMER und Mitarbeiter, FLIMM, EK und RAYNER, BÜCHERL und SCHWAB, D' AGOSTINO und JAKOBELLIS, NOGUCHI, ASHER und MESSERLI, WEICKSEL, GEBHARDT u.a.) Diese Leukozytose ist durch eine Granulozytose bei niedriger Lymphozytenzahl gekennzeichnet. Zwischen dem sechsten und zehnten postoperativen Tag normalisieren sich dann die segmentkernigen Granulozyten und Lymphozyten, um später bei glatter Wundheilung in eine Lymphozytose zum Teil auch Monozytose bei relativer Granulozytopenie umzuschlagen. (K.A. LENNERT und W. MONDORF - 18 -)

PALMER und Mitarbeiter (23) haben das Zustandekommen der Leukozytose nach Splenektomie an Albinoratten besonders gründlich studiert. Der Einfluß der Milz ist sicher spezifisch, da eine Resektion des Omentums oder eine einseitige Nierenresektion eine viel geringere Leukozytose verursacht. Ebenso kann die Leukozytose durch Transplantation eines kleinen Milzstückchens in die Bauchdecken verhütet werden.

Das führte zu der Annahme, daß die Milz offenbar für die Erhaltung des Gleichgewichtes in der Verteilung der weißen Blutzellen eine Rolle spielt und dabei das Knochenmark beeinflußt wird. Hinzu kommen die klinischen Beobachtungen in Fällen von Hypersplenismus mit Pancytopenie (19). Schon FRANK hat vor ca. 60 Jahren diese Dinge richtig gesehen und auf einen humoralen Knochenmarkhemmstoff geschlossen, der von der überfunktionierenden Milz abgegeben wird. Auch in jüngster Zeit konnte von O. FRESEN und H. KRETSCHMER (11) in Untersuchungen am Meerschweinchen nach Splenektomie eine Vermehrung der Leukozyten beobachtet werden. Diese Leukozytose bleibt auch bestehen nach Rückgang der operationsbedingten Leukozytose. Die gesunde Milz hat also auf die gesamte Häthropoese einen regulierenden Einfluß, der an einer nach Splenektomie überschüssigen Aktivierung des Knochenmarks erkennbar wird. (FRESEN und KRETSCHMER)

Zu den oben genannten Beobachtungen im Falle des Hypersplenismus und des Zustandes nach Splenektomie (22, 31) wurden weiterhin Schritte unternommen, den pathogenetischen Mechanismus zu erforschen.

Die diskutierte Möglichkeit einer erhöhten Milzfunktion bei Splenomegalie führte zu Versuchen, künstliche Splenomegalien (7) zu erzeugen, in der Annahme, durch verstärkte Reizung des reticuloendothelialen Systems eine vermehrte Ausschüttung regulativer humoraler Substanzen zu bewirken.

PALMER und Mitarbeitern (23) gelang es bei Ratten durch Injektion von Methylzellulose, die in der Milz gespeichert wird, eine Splenomegalie mit Anämie und Leukopenie zu erzeugen. Besonders eindrucksvoll ist ein Versuch von BALDINI (4), der nach dem Vorbild PALMERS an Ratten Splenomegalien mit Methylzellulose induzierte. Neugeborene Ratten gesunder Eltern wurden von splenomegalen Mutterratten gefüttert und entwickelten nach 14 Tagen Laktation eine Anämie. Ein Teil dieser Rattenbabies wurde splenektomiert und wuchs mit normalem peripheren Blutbild heran. Dadurch konnte BALDINI eindeutig die Anwesenheit humoraler Milzfaktoren in der Rattenmilch nachweisen.

PÉREZ - TAMAYO (24) injizierten Harn solcher experimentell hypersplenischen Ratten durch eine Sonde in ihren Magen und erzeugten eine Anämie mit Thrombozytopenie.

K.H. JAEGER und H. MITTENZWEI (17) gelang bei jungen Kälbern die Erzeugung experimenteller Splenomegalien durch Injektion stark hypertoner Salzlösungen. Mit wässrigen eiweißfreien Extrakten dieser vergrößerten Milzen konnten bei myeloischen Leukämien bedeutende Rückgänge der Leukozytenzahlen im peripheren Blut erreicht werden. (33)

Daneben kann experimenteller Hypersplenismus durch Injektion von Hydroxylamin (27) erzeugt werden, einer für das RES toxischen Substanz.

Zudem wird berichtet von Versuchen mit Unterbindung der Milzvene (5), Anwendung von Anti-Knochenmark-Serum (6), Injektionen hochmolekularer Substanzen wie Polyvinyl-Alkohol oder Methylzellulose (16). Für einen hemmenden Einfluß der Milz spricht auch die Beobachtung, daß die Fütterung von Ratten mit frischer, roher Milz zu Leukopenie führt. (CROSBY und RUIZ - 8 -, - 28 -)

Wir konnten sehen, daß bei einer großen Anzahl von Veröffentlichungen (14) ein oder mehrere humorale Milz- bzw. Serumfaktoren postuliert werden; diese konnten jedoch noch nicht isoliert werden. (HEILMEYER)

Wir versuchten nun bei unseren Untersuchungen, detaillierte Kenntnisse über die biochemische Natur und die hämatologischen Wirkungen der postulierten Faktoren zu gewinnen. Aufgrund der Tatsache, daß die gesunde Milz auf die gesamte Hämopoese einen regulierenden Einfluß ausübt, kamen wir zu der Arbeitshypothese, daß diese Faktoren in geringerer Konzentration auch in gesunden Säugetieren vorhanden seien. Für die nachfolgenden Untersuchungen verwendeten wir Milzgewebe und Serum gesunder Kälber.

II. MATERIAL UND METHODIK

1) P r ä p a r a t i o n d e r E x t r a k t e

Für nachfolgende Analysen war es von großer Wichtigkeit, möglichst frisches Kalbsblut und Milzgewebe gleich am Ort der Schlachtung zu erhalten. Das Alter der geschlachteten Tiere lag zwischen sechs und acht Wochen. Zur optimalen Homogenisierung und Zellaufschließung des Gewebes verwendeten wir einen Ultra-Turrax Homogenisator der Firma Janke & Kunkel KG.

Bei den unten beschriebenen Dialysen wurden ausschließlich VISKING - Dialysierschläuche der Firma SERVA Feinbiochemica verwendet. Der mittlere Porenradius beträgt 24 Angström; Wasser und niedermolekulare Verbindungen sowie Ionen diffundieren mit großer Leichtigkeit, Proteine und Bakterien werden nicht durchgelassen. Die Dialyse erfolgte jeweils bei $+ 4^{\circ} \text{C}$, um ein mögliches Bakterienwachstum auf ein Minimum zu reduzieren. Zusätzlich wurden Oxacillin und Ampicillin in das Dialysat gegeben. (ca. 100 mg Oxacillin und 100 mg Ampicillin / 1)
Im folgenden sollen nun die drei verschiedenen Präparationsverfahren der Milzextrakte beschrieben werden:

Milz - PRÄPARATION A

540 g Kälbermilz wurden mit aqua dest. p.i. 1 Volumen ad 6 Volumen verdünnt und homogenisiert. Hierauf erfolgte die erste Dialyse. 6 Volumen Kälbermilz wurden gegen 60 Volumen aqua dest. für 24 Stunden dialysiert; das entspricht dem Volumen-Verhältnis 1 : 10.

Das Dialysat wurde anschließend mit Hilfe eines Rotationsverdampfers auf ca. 800 ml eingedunstet, wobei die Wasserbadtemperatur 47°C , die Dampftemperatur $29^{\circ} - 31^{\circ}\text{C}$ betrug. Zur Trocknung kleinerer Mengen verwendeten wir jeweils das schonende Lyophilisierverfahren. Nach dieser groben Abtrennung großmolekularer Substanzen mit Hilfe der Dialyse erfolgte eine Entsalzung. Wir verwendeten dazu die Methode der Gelchromatographie, auf die in Abschnitt 2 noch ausführlich eingegangen wird, und zwar Sephadex G - 10 (Säule: 81 cm x 14,2 cm). Dieser Gel - Typ besitzt einen Fraktionierbereich von MG 0 - 800. Das heißt Stoffe mit MG $> 700 - 800$ wurden im Ausschlußvolumen gesammelt. Der anschließend lyophilisierte Milzextrakt wurde weiterhin einer zweiten Dialyse unterzogen; für 24 Stunden wurden 40 ml gegen 800 ml aqua dest. dialysiert.

Es folgte eine wiederholte Entsalzung mit Sephadex G - 10 (Säule: 2,5 cm x 90 cm). Eine dritte Dialyse für 24 Stunden diente der nochmaligen Abtrennung von kontaminierenden Proteinspuren.

Milz - PRÄPARATION B

1000 g Kälbermilz wurden mit aqua dest. p.i. 1 ad 4 Volumen verdünnt und homogenisiert. Diese 4 Volumen Kälbermilz wurden gegen 20 Volumen aqua dest. für 24 Stunden dialysiert; das entspricht dem Volumen - Verhältnis von 1 : 5. Nach dem Eindampfen wurde der Extrakt mit Sephadex G - 10 (Säule: 81 cm x 14, 2 cm) entsalzt und anschließend zum zweiten Mal für 24 Stunden dialysiert. (40 ml Extrakt gegen 800 ml aqua dest.) Hierauf folgte noch ein Säulenlauf mit Sephadex G - 50 zur Abtrennung höhermolekularer Verunreinigungen.

Milz - PRÄPARATION C

2000 g Kälbermilz wurden wie bei Präparation B mit aqua dest. p.i. 1 ad 4 Volumen verdünnt und homogenisiert. Die Dialyse erfolgte ebenfalls im Volumen-Verhältnis 1 : 5 für 24 Stunden. Die Gelchromatographie mit Sephadex G - 10 wurde zweimal durchgeführt; 1. Säule: 81 cm x 14,2 cm; 2. Säule: 2,5 cm x 90 cm. Anschließend erfolgte die zweite Dialyse für 24 Stunden.

Nachstehend sollen nun die zwei verschiedenen Präparationsverfahren der Serumextrakte beschrieben werden.

Serum - PRÄPARATION A

1000 ml Kälberserum wurden gegen 20 Volumen aqua dest. für 24 Stunden dialysiert; dies entspricht dem Dialyseverfahren bei Milz B, Milz C und Serum B. Nach der Destillation des Dialysates mit Hilfe des Rotationsverdampfers konnte die Abtrennung niedermolekularer Substanzen ($MG < 700 - 800$) mit Sephadex G - 10 (Säule: 14,2 cm x 81 cm) unternommen werden. Die zweite und dritte Dialyse dauerte ebenfalls 24 Stunden. Anschließend wurde nochmals eine Entsalzung mit Sephadex G - 10 (Säule: 2,5 cm x 90 cm) vorgenommen.

Serum - PRÄPARATION B

2000 ml Kälberserum wurden gegen 20 Volumen aqua dest. für 48 Stunden dialysiert. Es wurde außerdem zweimal mit Sephadex G - 10 entsalzt, einmal mit Säule 14,2 cm x 81 cm, zum anderen mit Säule 2,5 cm x 90 cm. Höhermolekulare Substanzen konnten mit Sephadex G - 50 in zweimaligem Lauf abgetrennt werden.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Präparationsverfahren.

Tabelle 1

Übersichtstabelle der einzelnen Präparationsarten

Milz A	Milz B	Milz C	Serum A	Serum B	Inaktivierungs- versuch 1	Inaktivierungs- versuch 2
Homogenisierung Milz ad 6 Vol.	Homogenisierung Milz ad 4 Vol.	Homogenisierung Milz ad 4 Vol.	-----	-----	Homogenisierung Milz ad 6 Vol.	Homogenisierung Milz ad 4 Vol.
1. Dialyse 6 Vol. Milz in 60 Vol. 24 Std.	1. Dialyse 4 Vol. Milz in 20 Vol. 24 Std.	1. Dialyse 4 Vol. Milz in 20 Vol. aqua dest. 24 Std.	1. Dialyse 1 Vol. Serum in 20 Vol. aqua dest. 24 Std.	1. Dialyse 1 Vol. Serum in 20 Vol. aqua dest. 48 Std.	1. Dialyse 6 Vol. Milz in 60 Vol. 24 Std.	1. Dialyse 4 Vol. Milz in 20 Vol. aqua dest. 24 Std.
Gelfiltration G - 10 (81 cm x 14,2 cm)	Gelfiltration G - 10 (81 cm x 14,2 cm)	Gelfiltration G - 10 (81 cm x 14,2 cm)	Gelfiltration G - 10 (81 cm x 14,2 cm)	Gelfiltration G - 10 (81 cm x 14,2 cm)	Gelfiltration G - 10 (81 cm x 14,2 cm)	Gelfiltration G - 10 (81 cm x 14,2 cm)
2. Dialyse 24 Std.	2. Dialyse 24 Std.	2. Dialyse 24 Std.	2. Dialyse 24 Std.	Gelfiltration G - 50	2. Dialyse 24 Std.	Gelfiltration G - 25 (60 cm x 5 cm)
Gelfiltration G - 10 (2,5 cm x 90 cm)	Gelfiltration G - 50	Gelfiltration G - 10 (2,5 cm x 90 cm)	Gelfiltration G - 10 (2,5 cm x 90 cm)	Gelfiltration G - 10 (2,5 cm x 90 cm)	Gelfiltration G - 10 (2,5 cm x 90 cm)	-----
3. Dialyse 24 Std.	-----	-----	3. Dialyse 24 Std.	Gelfiltration G - 50	3. Dialyse 24 Std.	-----

2) G e l c h r o m a t o g r a p h i e

Die Gelfiltration als chromatographisches Trennverfahren hat sich zu einer Standardmethode der Laboratoriumstechnik entwickelt. Im chromatographischen Prozess der Gelfiltration werden Größenunterschiede zwischen verschiedenartigen Molekülen zu ihrer Trennung ausgenutzt. (25)

Wir verwendeten für unsere säulenchromatographischen Trennungen Material der Firma Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Schweden). Als Trennmateriel benutzten wir ausschließlich Sephadex, ein modifiziertes Dextran, dessen Polysaccharidketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind und sich durch ihren Quellgrad in Wasser typisieren lassen. Bei den präparativen Trennprozessen (siehe I 1) kam Sephadex Typ G - 10 und Typ G - 50 zur Anwendung. Für die anschließenden analytischen Trennversuche wählten wir Sephadex G - 25. Die Daten der von uns benutzten Säulen sind folgende:

Präparation

	Geltyp	Säulenmaße	Fraktionierbereich	
1)	G - 10	81 cm x 14,2 cm	MG	0 - 700
2)	G - 10	90 cm x 2,5 cm	MG	0 - 700
3)	G - 50	60 cm x 5,0 cm	MG	1500 - 30000

Analyse

4)	G - 25	299 cm x 5,0 cm	MG	1000 - 5000
----	--------	-----------------	----	-------------

Die Wahl des für einen Trennprozess günstigsten Sephadex - Typs hängt vor allem von den Molekülgrößen der zu trennenden Komponenten ab, ferner auch von deren chemischen Eigenschaften.

Jeder Sephadex - Typ trennt hauptsächlich innerhalb eines bestimmten Molekulargewichtsbereiches, dem Fraktionierungsbereich, der durch den Quellgrad des Gels festgelegt ist. Die obere Grenze der Molekülgröße stellt die Ausschlußgrenze dar; die Moleküle dringen nicht in das Gel ein. Kleine Moleküle mit Molekulargewichten unterhalb des Fraktionierungsbereiches verlassen die Säule bei einem Elutionsvolumen, das etwa dem Volumen der gesamten Säulenfüllung entspricht. Die gewünschten Eluatvolumina wurden rechnerisch oder experimentell mit Testsubstanzen bekannten Molekulargewichtes ermittelt.

Analytische Trennversuche mit G - 25 (299 cm x 5 cm)

Der chromatographische Prozess konnte quantitativ gemessen werden, wobei die Lichtabsorption im Bereich der Peptidabsorptionsbanden des Eluates durch einen Detektor kontinuierlich gemessen und registriert wurde. Als Detektor benutzten wir einen Beckmann DB - G Spectrophotometer. Die kontinuierliche Messung wurde mit einer Quarz-Durchflußküvette bei 210 m μ durchgeführt und von einem Beckmann 10 Zoll - Recorder registriert. Gleichzeitig wurde das Eluat von einem Fraction Collector Radi Rac LKB Type 3403 B in Fraktionen gesammelt. Für einen gleichmäßigen Säulendurchfluß sorgte eine LKB ReCychrom Peristaltic-Pump Type 4912 A. Das aufgetragene Probevolumen lag zwischen 5 und 20 ml. Vor jedem Trennversuch sorgte ein mehrstündiger Probelauf für gleichmäßigen Durchfluß zur konstanten Durchflußmenge pro Zeit. Für Trennversuche der Milzpräparation A und B und der Serumpräparation A wurde als Trennmedium aqua dest. verwendet. Zur Verhinderung einer Wechselwirkung zwischen gelösten Ionen und der Sephadex-Matrix, verwendeten wir für die Milzpräparation C, die Serumpräparation B und die Inaktivierungsversuche als Trennmedium Ammoniumcarbonat (NH_4)₂ CO₃ .

Diese Wechselwirkung kann durch eine geringe Zahl von Carboxylgruppen an der Matrix bei Trennmedien mit Ionenstärken unterhalb 0,02 hervorgerufen werden.

(NH_4) CO_3 ist ein flüchtiger Puffer mit Ionenstärke 0,03 und kann im Lyophilisierverfahren vollständig eliminiert werden. (20)

In verschiedenen Testläufen versuchten wir zudem eine Korrelierung zwischen Molekulargewicht und Eluatvolumen zu erzielen. Dazu verwendeten wir folgende Testsubstanzen:

- | | | |
|----------------------------|------|-----------|
| 1) Vitamin B ₁₂ | MG = | 1 355 |
| 2) Dextranblau | MG = | 2 000 000 |
| 3) Bacitracin | MG = | 1 450 |

3) T i e r v e r s u c h e

Die biologische Testung der verschiedenen Eluatfraktionen erfolgte mit weiblichen NMRI - Mäusen der Versuchstierfarm H. Voss, Tuttlingen. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug 20 - 25 g. Lediglich die Tiersendung für die Testung der Milzpräparation B zeigte ein Durchschnittsgewicht von 10 - 12 g.

Zur Injektion wurden die Eluatfraktionen vollständig lyophilisiert und dann mit physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Die Einzeltierdosis betrug bei den verschiedenen Versuchen:

- 1) Milzpräparation A : 20 g - Äquivalent / Injektion
- 2) Milzpräparation B : 30 g - Äquivalent / Injektion
- 3) Milzpräparation C : 50 g - Äquivalent / Injektion
- 4) Serumpräparation A : 50 g - Äquivalent / Injektion
- 5) Serumpräparation B : 50 g - Äquivalent / Injektion

Das Volumen der Einzeldosis betrug jeweils 0,1 ml und wurde mit einer Tuberkulinspritze intraperitoneal appliziert.

Bei den einzelnen Tierversuchen wurde jeweils einem Kontrollkollektiv die gleiche Menge physiologische Kochsalzlösung gespritzt. Zur Vermeidung bakterieller oder viraler Affektionen mit Auswirkung auf das periphere Blutbild, wurden die Versuche am Tag nach der Tierlieferung durchgeführt.

Die Blutabnahme aus der Schwanzvene erfolgte 6 Stunden post injectionem unter kurzdauernder Äthernarkose. Lediglich bei Milzpräparation A wurde erst 24 Stunden später das Blut abgenommen.

Anschließend an die Blutabnahme wurden die Leukozytenzahlen mit einem Counter der Firma Coulter Electronics LTD Modell D bestimmt. Dazu wurde eine Eichkurve angefertigt; jede Messung wurde mindestens einmal wiederholt, bei Differenzen der Mittelwert gebildet.

Um die hämatologische Auswertung übersichtlich zu gestalten, wurden für alle Milz- und Serumfraktionen die Durchschnittswerte der Blutzellzahlen ermittelt und tabellarisch aufgeführt. (Tabelle 3 und 4)

Für die Präparationen Milz C und Serum B sowie für Inaktivierungsversuch 2 wurde das weiße Blutbild differenziert. Wir beschränkten uns in der statistischen Auswertung auf Lymphozyten, neutrophile segmentkernige Granulozyten und Monozyten.

Die Meßergebnisse der Fraktionen wurden mit den Leerwerten entsprechend dem t - Test nach Student auf Signifikanz geprüft. Die Prüfung der Normalitätsverteilung der Meßwerte erfolgte mit dem David-Test. (Sachs S. 254) - 29 -

Diese Aussage nach David wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % gemacht. Meßreihen, die diese Bedingung nicht erfüllen konnten, wurden mit einem universelleren Test nach Kolmogoroff auf Signifikanz geprüft.

4) I n a k t i v i e r u n g s v e r s u c h e

Die oben genannten Untersuchungen dienten im wesentlichen dazu, Kenntnisse über das ungefähre Molekulargewicht der aktiven Faktoren zu erhalten. Sehr interessant ist jedoch auch die Frage nach der biochemischen Natur dieser Stoffe.

Wenn die Annahme richtig war, daß es sich bei diesen Faktoren um Peptide oder Peptidgemische handelte, so mußte sich deren biologische Wirkung durch enzymatische Spaltung mit Peptidasen abschwächen bzw. aufheben lassen. (12)

Als geeignetes Enzym fand sich PRONASE P (30), eine Protease aus *Streptomyces griseus* mit einem physiologischen P_H - Optimum von 7 - 8 und hoher Aktivität und breitem Wirkungsspektrum hinsichtlich der Art der Peptidbindungen.

Inaktivierungsversuch 1

Es wurden 1000 g Kälbermilz nach dem Muster von Milzpräparation A präpariert. Dieser Extrakt wurde aufgeteilt in 2 Teile à 500 g Kälbermilz. Beide Proben wurden anschließend in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert für 60 Minuten, wobei Probe 1 mit 2 mg/ml Pronase P versetzt wurde. Zur Abtrennung der Pronase aus dem Extrakt verwendeten wir Sephadex G - 25 (60 cm x 5 cm);

das proteinhaltige (Pronase) Ausschlußvolumen wurde verworfen. Auch der nichtinkubierte Teil wurde dieser Prozedur unterzogen. Im Tierversuch diente ein Kollektiv mit physiologischer Kochsalzlösung als Leerwert; ein Kollektiv wurde mit Pronase-Milzextrakt, ein weiteres mit Probe 2 entsprechendem Milzextrakt behandelt. Die Blutabnahme mit Bestimmung der hämatologischen Parameter erfolgte 6 Stunden nach der Injektion.

Inaktivierungsversuch 2

Die Milzpräparation fand folgendermaßen statt:

1000 g Kälbermilz wurden nach der ersten Dialyse mit Sephadex G - 10 (81 cm x 14,2 cm) entsalzt.

Die Reinigung von kontaminierenden Proteinen erfolgte mit G - 25 (5 cm x 60 cm).

Es wurde im Vergleich zu Inaktivierungsversuch 1 mit der 10 - fachen Dosis PRONASE P, nämlich mit 20 mg/ml inkubiert. Im Übrigen wurde entsprechend dem Inaktivierungsversuch 1 verfahren.

III. ERGEBNISSE

1) Ergebnisse der analytischen Säulentrennung mit Sephadex G - 25

Bei den Testläufen (G - 25, Trennmedium H_2O)
zur Korrelierung des Molekulargewichtes mit dem
Eluatvolumen ergab sich folgendes:

a) Dextranblau MG = 2 000 000

Elutionsmaximum bei 2580 ml

b) Bacitracin MG = 1 450

Elutionsmaximum bei 4375 ml

c) Vitamin B_{12} MG = 1 355

Elutionsmaximum bei 4906 ml

Der erste Trennprozess des Milzextraktes nach Prä-
paration A ergab eine differenzierte photometrische
Auftrennung, sodaß das Eluatvolumen entsprechend den
Extinktionsbanden fraktioniert werden konnte. (Abbil-
dung 1 und 2)

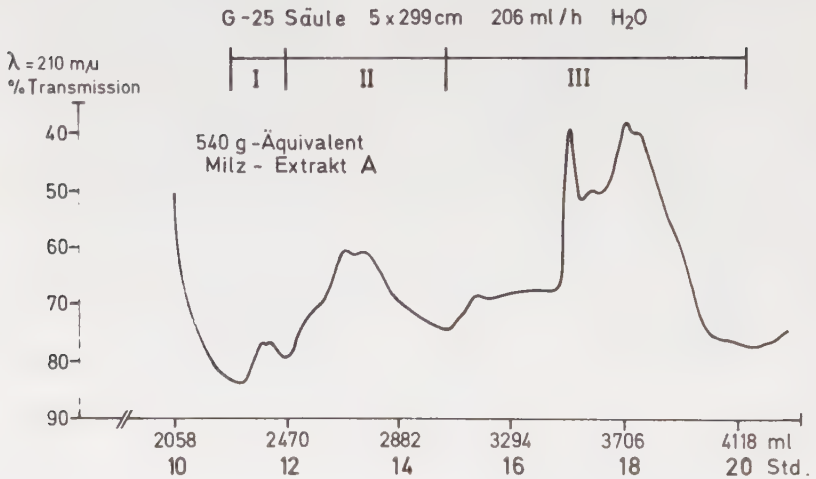
Wir teilten das gesamte Eluatvolumen in annähernd
gleiche Fraktionen auf, die nach Gefriertrocknung
biologisch getestet wurden. Fraktion 1 wurde hier-
bei so gewählt, daß sie das Ausschlußvolumen ent-
hielt. Die Volumina der einzelnen Fraktionen (F)
sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Die mit $(NH_4)_2CO_3$
durchgeführten optimalen Säulenfraktionierungen von
Milzpräparation C und Serumpräparation B hatten prak-
tisch identische Fraktionen, sodaß ein Vergleich mög-
lich ist.

Tabelle 2 Die Fraktionsvolumen der Säulen - Trennungen mit G - 25

<u>Milzpräparation A</u>		<u>Serumpräparation A</u>	
F I:	2264 - 2470 ml = 206 ml	F I:	1885 - 2525 ml = 640 ml
F II:	2470 - 3046 ml = 576 ml	F II:	2525 - 3325 ml = 800 ml
F III:	3046 - 4157 ml = 1111 ml	F III:	3325 - 4425 ml = 1100 ml
<u>Milzpräparation B</u>		F IV:	4425 - 5225 ml = 800 ml
F I:	3632 - 4605 ml = 973 ml	F V:	5225 - 6025 ml = 800 ml
F II:	4605 - 5313 ml = 708 ml		
F III:	5313 - 5844 ml = 531 ml		
<u>Milzpräparation C</u>		<u>Serumpräparation B</u>	
F I:	1800 - 2800 ml = 1000 ml	F I:	2150 - 2900 ml = 750 ml
F II:	2800 - 3600 ml = 800 ml	F II:	2900 - 3500 ml = 600 ml
F III:	3600 - 4400 ml = 800 ml	F III:	3500 - 4400 ml = 900 ml
F IV:	4400 - 5200 ml = 800 ml	F IV:	4400 - 5300 ml = 900 ml
F V:	5200 - 6800 ml = 1600 ml	F V:	5300 - 6200 ml = 900 ml

Abbildung 1

Transmissionskurve von Milzextrakt A



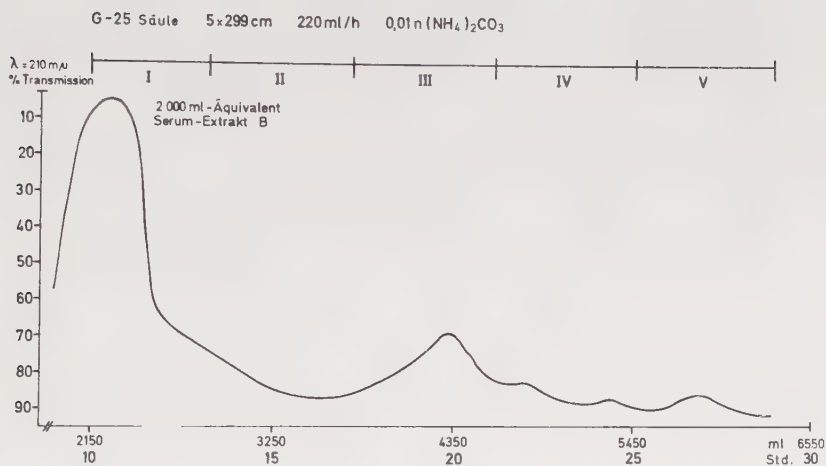
Auf der Abszisse ist das Durchflußvolumen pro Zeiteinheit aufgetragen.

Die Lichtabsorption ist auf der Ordinate zugeordnet.

Die Einteilung des Elutionsvolumens in die Fraktionen I, II und III erfolgte entsprechend den Absorptionsbanden.

Abbildung 2

Transmissionskurve von Serumextrakt B



Auf der Abszisse ist das Durchflußvolumen pro Zeiteinheit aufgetragen.
Die Ordinate ordnet die Lichtabsorptionen zu.
Entsprechend den Absorptionsbanden erfolgte die Einteilung des Durchflußvolumens in die Fraktionen I, II, III, IV und V.

2) Wirkungen der Milzfractionen und Serumfractionen

Die biologischen Wirkungen der einzelnen Milz- und Serum-fractionen wurden im Tierversuch getestet. Die hämatologische und statistische Auswertung ist aus Tabelle 3 und 4 ersichtlich.

Die leukopenisierende Wirkung auf Lymphozyten, Monozyten sowie Gesamtleukozytenzahl weist bei Milzextrakt C zwei Gipfel und bei Serumextrakt B drei Gipfel auf. Beim Vergleich von Milzextrakt C und Serumextrakt B fehlt beim Milzextrakt die leukopenisierende Komponente mit dem niedrigsten Molekulargewicht.

Die Fractionen mit Hebung der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten sind bei Milzextrakt C und Serumextrakt B hinsichtlich des Molekulargewichtsbereiches identisch (2 aktive Fractionen) ; es besteht jedoch keine Identität mit den Gipfeln der leukodepressiven Wirkung.

Die Ergebnisse der G - 25 Fractionierungen sind auch aus Abbildung 3 - 8 ersichtlich.

3) Inaktivierungsversuche

Der Inaktivierungsversuch 1 ergab keine signifikante Schwächung der Extraktwirkung.

Mittelwerte der Leukozytenkonzentration

Milzextrakt	:	6 000 / mm ³	
Mit Protease inkubierter Milzextrakt:		6 600 / mm ³	2 mg/ml
NaCl	:	8 000 / mm ³	

Tabelle 3
LeukozytenG - 25 Fraktionierung mit H_2O als Trennmedium

Milz A			Milz B			Serum A		
F	$\bar{x}$	2σ	F	$\bar{x}$	2σ	F	$\bar{x}$	2σ
I	9500	± 550	I	4400	± 2000	I	9900	± 330
II	13100	± 900	II	3000	± 1500	II	9400	± 380
III	9000	± 600	III	5000	± 1000	III	5600	± 270
NaCl	14800	± 850	NaCl	8400	± 3100	IV	7500	± 560
						V	7100	± 600
						NaCl	8500	± 330

G - 25 Fraktionierung mit $(NH_4)_2CO_3$ als Trennmedium

Leukozyten

Milz C			Serum B		
F	$\bar{x}$	2σ	F	$\bar{x}$	2σ
I	6800	± 440	I	3500	± 200
II	10900	± 650	II	6000	± 300
III	9000	± 260	III	5000	± 200
IV	11900	± 700	IV	8600	± 450
V	15000	± 1200	V	5500	± 250
NaCl	12100	± 800	NaCl	7900	± 400

 $\bar{x}$ = Mittelwert 2σ = doppelte Standardabweichung

P = Signifikanz gegen 0,9 % NaCl-Meßreihe

NaCl = 0,9 % ige Kochsalzlösung

Es schloß sich ein zweiter Inaktivierungsversuch der Milzextraktwirkung mit 10 - facher Protease-Dosis an.

Mittelwerte der Leukozytenkonzentration

Milzextrakt	:	6 800	/	mm ³	
Mit Protease inkubierter Milzextrakt:		13 000	/	mm ³	20 mg/ml
NaCl	:	15 000	/	mm ³	

Die Leukozytenzahlen nach Inkubation mit Pronase P können als fast identisch mit den NaCl - Kontrollwerten angesehen werden. Die Milzextrakt - Wirkung ist signifikant von der inkubierten Extraktwirkung unterschieden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,001$. (Abbildung 9)

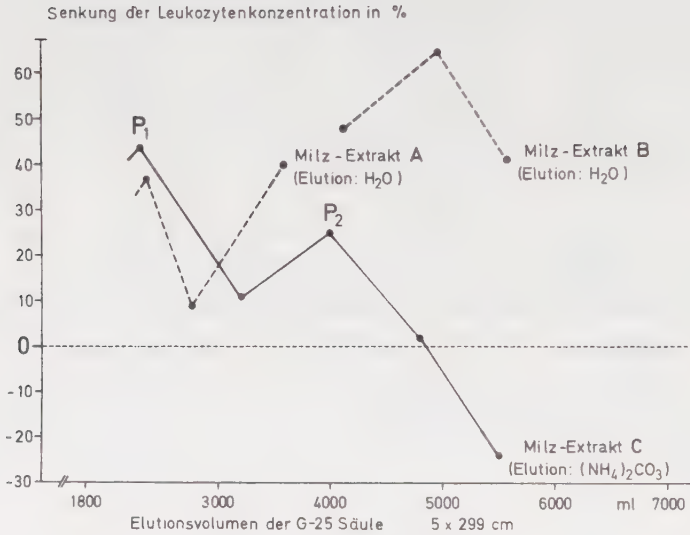
Tabelle 4

Weißes Blutbild

Milz C Lymphozyten					Serum B Lymphozyten				
F	$\bar{x}$	+	2 σ	P	F	$\bar{x}$	+	2 σ	P
I	3700	+	2400	<0,001	I	2100	+	1000	0,001
II	5500	+	4400	<0,005	II	3600	+	2600	<0,001
III	5800	+	3400	<0,005	III	3100	+	3000	<0,001
IV	8500	+	9000	> 0,05	IV	5500	+	4000	> 0,05
V	11200	+	10000	> 0,05	V	3200	+	2200	0,001
NaCl	9600	+	8200		NaCl	7200	+	5000	
Milz C Monozyten					Serum B Monozyten				
F	$\bar{x}$	+	2 σ	P	F	$\bar{x}$	+	2 σ	P
I	60	+	100	< 0,01	I	35	+	80	0,01
II	110	+	200	< 0,05	II	57	+	60	<0,001
III	60	+	100	< 0,01	III	46	+	70	<0,001
IV	120	+	150	0,05	IV	82	+	130	0,01
V	160	+	280	> 0,05	V	64	+	100	0,001
NaCl	220	+	500		NaCl	180	+	240	
Milz C neutr. segm. Granulozyten					Serum B neutr. segm. Granulozyten				
F	$\bar{x}$	+	2 σ	P	F	$\bar{x}$	+	2 σ	P
I	3000	+	2200	0,05	I	1400	+	1600	0,025
II	4800	+	3800	<0,005	II	2400	+	1800	0,001
III	3000	+	2400	< 0,05	III	2400	+	2200	0,001
IV	4000	+	3400	0,005	IV	3200	+	2500	0,001
V	3300	+	4400	0,05	V	2200	+	1500	0,001
NaCl	2200	+	2000		NaCl	870	+	1000	

Abbildung 3

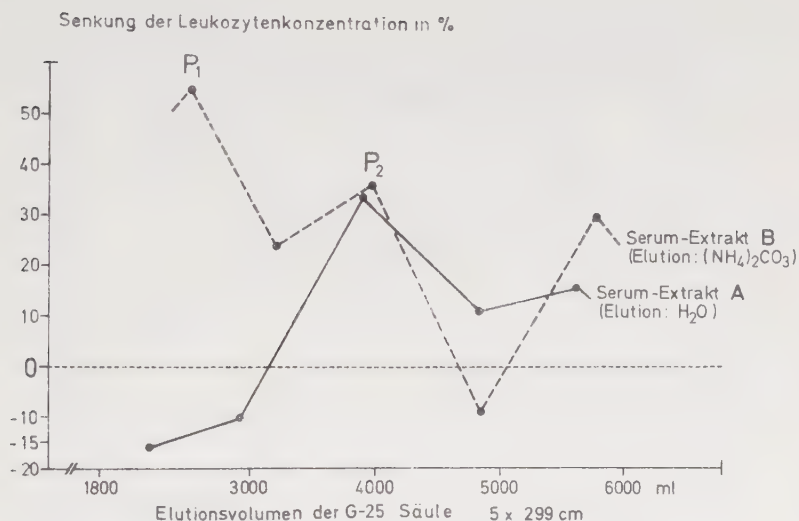
Die Wirkung der Milzextrakt - Fraktionen auf die Leukozytenkonzentration



Auf der Abszisse sind die mittleren Fraktionsvolumen der G - 25 Säule aufgetragen. Die Senkung der Leukozytenzahlen in Prozent ist auf der Ordinate zugeordnet. Die Null - Linie markiert die Kontrollwerte. P₁ und P₂ zeigen die beiden Wirkungsgipfel des Milzextraktes C entsprechend den Fraktionen I und III.

Abbildung 4

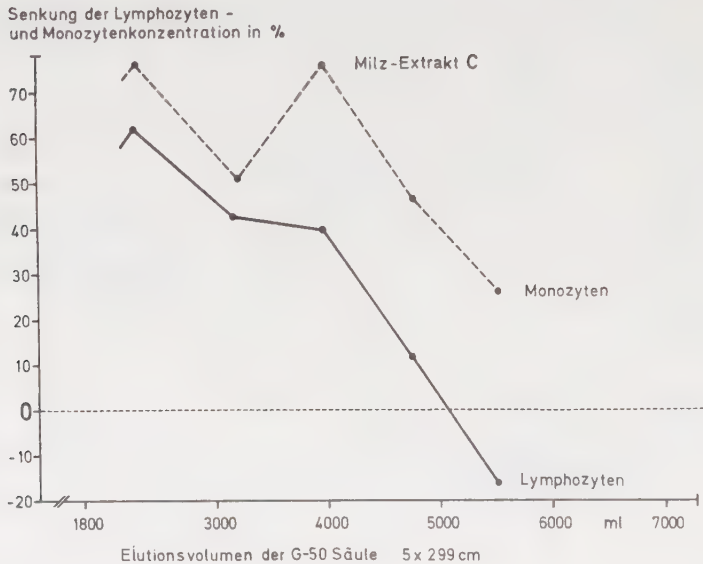
Die Wirkung der Serumextrakt - Fraktionen auf die Leukozytenkonzentration



Auf der Abszisse sind die mittleren Fraktionsvolumina der G - 25 Säule aufgetragen. Die Senkung der Leukozytenzahlen in Prozent ist auf der Ordinate zugeordnet. Die Null - Linie markiert die Kontrollwerte. P₁ und P₂ zeigen die Wirkungsgipfel von Fraktion I und III bei Serumextrakt B, welche mit den Milzextrakt - Fraktionen identisch sind. Zusätzlich weist Serumextrakt B einen dritten Wirkungsgipfel auf.

Abbildung 5

Die Wirkung der Milzextrakt - Fraktionen auf die Lymphozyten- und Monozytenkonzentration

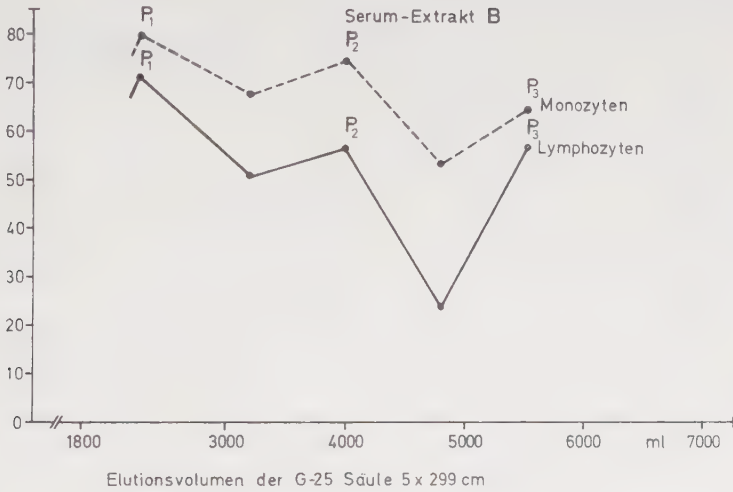


Auf der Abszisse sind die mittleren Elutionsvolumina der fünf Milzextrakt-Fractionen aufgetragen. Die Senkung der Lymphozyten- und Monozytenkonzentration ist auf der Ordinate zugeordnet. Die Kontrollwerte sind als Null - Linie eingezeichnet. Der Kurvenverlauf von Lymphozyten wie Monozyten läßt sich mit dem Kurvenverlauf der Leukozytenkonzentration bei Milzextrakt C in Abbildung 3 vergleichen. In beiden Fällen sind zwei Wirkungsgipfel in Fraktion I und III erkennbar.

Abbildung 6

Die Wirkung der Serumextrakt - Fraktionen auf die Lymphozyten - und Monozytenkonzentration

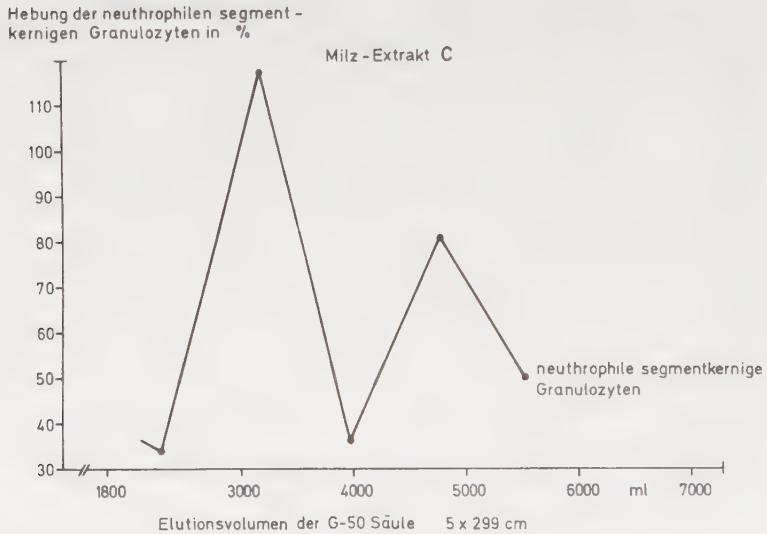
Senkung der Lymphozyten- und Monozytenkonzentration in %



Auf der Abszisse sind die mittleren Elutionsvolumina der fünf Serumextraktfraktionen aufgetragen. Die Senkung der Lymphozyten- und Monozytenkonzentration, die auf der Ordinate eingezeichnet ist, zeigt drei Wirkungsgipfel. Die Null - Linie stellt die Kontrollwerte dar.

Abbildung 7

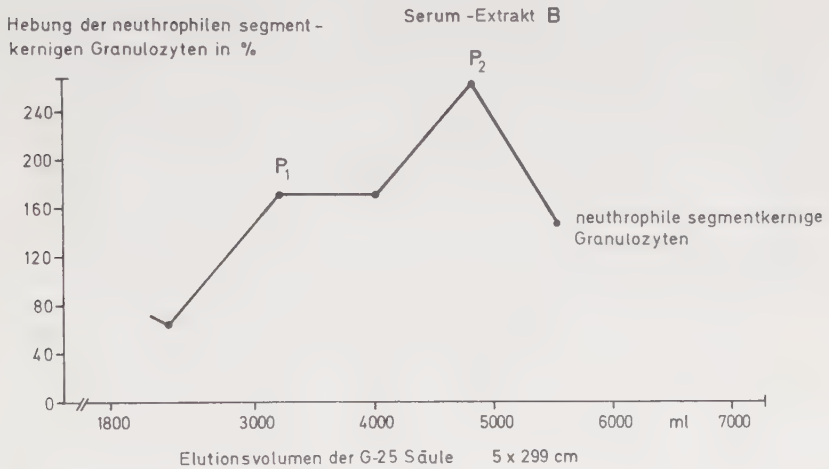
Die Wirkung der Milzextrakt - Fraktionen auf die Konzentration der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten.



Die Hebung der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten ist auf der Ordinate eingezeichnet, die mittleren Elutionsvolumen der Fraktionen auf der Abszisse. Die Milz - Fraktionen II und IV bewirken eine deutliche Anhebung der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten, während die leukodepressiven Fraktionen I und III nur eine schwache Erhöhung dieser Blutzellen bewirken.

Abbildung 8

Die Wirkung der Serumextrakt - Fraktionen auf die Konzentration der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten



Auf der Abszisse sind die mittleren Elutionsvolumina der fünf Serumextrakt - Fraktionen aufgetragen. Auf der Ordinate ist die Hebung der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten in Prozent angegeben. Wie bei Milzextrakt C zeigt sich die anhebende Wirkung besonders in Fraktion II und IV (P₁ und P₂).

Abbildung 9

Der proteolytische Effekt (Pronase P) auf die hämatologische Aktivität von Milzextrakt.

	Leukozyten	Lymphozyten	Monozyten	neutr. segm. Granulozyten	neutr. jug. Granulozyten
Milz- extrakt	- 54 %	- 72 %	- 51 %	+ 167 %	+ 261 %
Milz- extrakt + Pronase	- 13 %	- 23 %	+ 63 %	+ 110 %	+ 99 %

0,9 % NaCl-Kontrolle = 100 %

60 min. Inkubation bei 37° C; 20 mg Pronase P/ml

Die Abweichung der Blutzellenkonzentrationen von der 0,9 % igen NaCl - Kontrolle ist in Prozent angegeben. Der Milzextrakt besitzt eine sehr viel stärkere hämatologische Aktivität, die sich in den höheren prozentualen Abweichungen von den Normalwerten ausdrückt. Pronase P ruft eine deutliche Verminderung dieser Aktivität hervor.

IV. DISKUSSION

Durch unsere Untersuchungen konnte die Existenz von Faktoren in der Milz und dem Serum von gesunden Kälbern mit Wirkung auf das leukozytäre periphere Blutbild von Säugetieren (Mäuse) nachgewiesen werden. Zumindest teilweise sind diese Faktoren Peptide mit niederem Molekulargewicht. Was die biochemische Natur betrifft, versuchten wir, eine möglichst genaue Lokalisierung dieser Faktoren entsprechend dem Elutionsvolumen zu erzielen. Es existiert zwischen dem Elutionsverhalten und dem Molekulargewicht eine enge Relation (P. ANDREWS - 3 -); viele Moleküle weichen jedoch erheblich von dem bei der Gelfiltration normalerweise üblichen Elutionsverhalten ab. So zeigen aromatische Verbindungen (homozyklische wie heterozyklische) wie zum Beispiel Tyrosin und Tryptophanpeptide eine grössere Affinität zum Sephadex Gel als zur wässrigen Phase. (P. ZISKA - 34 -) Eine Ionenstärke unter 0,02 der Trennmedien hat einen Effekt auf geladene Moleküle. Positiv geladene Moleküle werden daher bei der Elution verzögert, negativ geladene Ionen eilen entsprechend vor (20). Auch wird eine Wirkung der Ionenstärke auf bestimmte Peptidstrukturen beschrieben. (AKERKAR A.S. - 1 -) Molekularsiebe trennen nach Molekülgröße und Konfiguration, diese Molekülgröße ist meist mit dem Molekulargewicht korreliert.

Vereinfacht läßt sich sagen, daß die Poren des Gels ein globuläres Protein höheren Molekulargewichtes noch aufnehmen können wegen des kleineren Durchmessers, eine Peptidkette, die länger ist als der Perldurchmesser, jedoch ausschließen. Ähnliche Gesetzmäßigkeiten gelten für die Dialyse mit semipermeablen Membranen. Die Grenze dieser Methoden liegt darin, daß sich mit ihnen das Molekulargewicht nur angenähert bestimmen läßt. Für den Molekulargewichtsbereich, in dem die Serum- und Milzfaktoren liegen, lassen sich folgende Aussagen diskutieren. Aus der gemeinsamen Betrachtung der mittleren gemeinsamen Elutionsvolumina von Milz und Serum für Fraktion I = 2300 ml (P_1) und Fraktion III = 4000 ml (P_2) läßt sich sagen, daß das Molekulargewicht der Milz- und Serumfaktoren zwischen 700 - 800 und 3000 - 5000 liegt.

Entsprechend der besonders starken Aktivität des Ausschlußvolumens von G - 25 hinsichtlich der Senkung der Leukozytenkonzentration des peripheren Blutes ist die Existenz von leukopenisierenden Faktoren im Molekulargewichtsbereich über 5000 möglich. Aus der weitgehenden Wirkungsgleichheit von Milz- und Serumfaktoren läßt sich auf eine gemeinsame Bildungsstätte im RES der Milz schließen, sowie auf eine ähnliche, wenn nicht identische biochemische Natur dieser Stoffe. Außerdem muß man annehmen, daß auch Anteile des RES in anderen Organen mitbeteiligt sein können an der Bildung dieser Faktoren. Vergleichende Untersuchungen in unserem Labor scheinen dies zu belegen. H.H. v. ALBERT (2) ist der Frage nach gegangen, an welcher Stelle im Stoffwechsel ein möglicher Angriffspunkt hemmungswirksamer Faktoren der Milz liegen könnte.

Es ließ sich zeigen, daß hypersplene Milzen am C - 1 Stoffwechsel der Zellkerne angreifen. Enzymuntersuchungen machten eine Hemmung der FH - 4 - Formylase und Oxymethyl - FH - 4 - Dehydrogenase deutlich. Unsere Untersuchungen ergeben eine sehr spezifische Wirkung der Extrakte. Die Senkung der Leukozytenzahlen in Fraktion I, III und V ergibt sich bei Überlagerung zweier verschiedener Wirkungen, der Senkung der Lymphozyten und Monozyten und einer mäßigen Erhöhung der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten. In Fraktion II und IV wird die Leukozytenkonzentration durch Hebung der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten weitgehend den Kontrollwerten angeglichen. 1964 wurde von RUHENSTROTH - BAUER (12) nachgewiesen, daß nach Ganzkörperbestrahlung von Ratten mit Röntgenstrahlen eine Ausschwemmung von membranunreifen, kernreifen Granulozyten aus dem Knochenmark erfolgt. Der wirksame Faktor wurde auch an gesunden Ratten und Rindermilzen nachgewiesen. Dieses Peptid (Granulomovin) ließ sich auch mit Pronase zerstören. Ähnliche bzw. identische Peptide stellen möglicherweise die von uns nachgewiesenen Faktoren mit Erhöhung der Konzentration der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im peripheren Blut dar. Die Ergebnisse der Inaktivierungsversuche sind eine Bestätigung der Arbeitshypothese, wonach es sich bei den Milz- und Serumfaktoren um Peptide oder Peptidgemische handelt.

Man kann hoffen, daß diese physiologischen Faktoren einer genaueren Analyse mit feineren Methoden zugeführt werden und Eingang in die Therapie chronischer Leukämien finden oder als immunsuppressorische Substanzen zur Anwendung kommen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte die Existenz von Faktoren in Milz und Serum von gesunden Kälbern mit Wirkung auf das leukozytäre periphere Blutbild von NMRI - Mäusen nachgewiesen werden.

Die chromatographische Auftrennung der präparierten Milz- und Serumextrakte erfolgte mit Sephadex G - 25. Die leukopenisierende Wirkung auf Lymphozyten, Monozyten sowie Gesamtleukozytenzahl wies bei dem Milzextrakt zwei Gipfel, bei dem Serumextrakt drei Wirkungsgipfel auf. Hinsichtlich des Molekulargewichtsbereiches bestand zwischen der Wirkung von Milzextrakt C und Serumextrakt B Übereinstimmung.

Zwei Fraktionen mit Hebung der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten waren ebenfalls bei Milzextrakt C und Serumextrakt B hinsichtlich des Molekulargewichtsbereiches identisch. Es bestand jedoch keine Identität mit den Gipfeln der leukodepressiven Wirkung. Die leukopenisierende Wirkung dieser Faktoren ließ sich fast vollständig mit Bakterienprotease aufheben. Zumindest teilweise sind diese Faktoren Peptide mit niederem Molekulargewicht von 700 - 800 bis 3000 - 5000.

Entsprechend der besonders starken Aktivität des Ausschlußvolumens von G - 25 hinsichtlich der Senkung der Leukozytenkonzentration des peripheren Blutes ist an die Existenz von leukopenisierenden Faktoren im Molekulargewichtsbereich über 5000 zu denken.

SUMMARY

The existence of factors of spleen tissue and serum of healthy calves with leucopenizing effect upon peripheral blood status of NMRI - mice could be traced.

Seperation into different mol. w. fractions of spleen extracts and serum extracts was done by Sephadex G - 25 gel chromatography.

There were 2 peaks of leukopenic effect at spleen extract and 3 peaks at serum extrakt, concerning lymphocytes, monocytes and total leukocyte count. There was a coincidence of effects of identical spleen and serum mol. w. fractions at spleen extract C and serum extract B.

There was also a coincidence of effects of 2 fractions effecting elevation of neutrophil polymorphonuclear segmented granulocytes at spleen extract C and serum extract B; there was no coincidence with the peaks of w.b.c. depression.

Leucopenic effect was almost totally neutralized by bacterial Protease Pronase P; therefore at least partially these leucopenizing factors are polypeptides in the mol.w. range of 700 - 800 til > 3000 - 5000.

According to the relative strong activity of exclusion volume of G - 25 concerning leucopenic effect the existence of factors with mol. w. > 5000 is possible.

VI. SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

1. AKERKAR, A.S. Effect of Ionic Strength on Poly
(D - Asp - L - Lys) in Sephadex -
Gelfiltration
Journal Chromatographic
S 1 (1970)
2. v. ALBERT, H.H., Biochemische Untersuchungen über
knochenmarkswirksame Faktoren in Milz-
extrakten
Zschr. inn. Med. 24, 16 (1969)
3. ANDREWS, P. Estimation of the Molekular Weights of
Proteins by Sephadex - Gelfiltration
Biochem. J. 91, 222 - 233 (1964)
4. BALDINI, M. Banti's view of Splenic Anemia
Hypersplenism and the Humoral Factor
Proceedings VI
Congress of the International Society
of Hematology
New York, Grune & Stratton, 422 (1958)
5. BOCK, H.E., FRENZEL, B. Splenogene Knochenmarkhemmung
Klinische Wochenschrift 17, 1315 (1938)
6. BYORKLUND, B., HELLSTROM, L.
Studies on the Effect of Antibone Marrow
serum
Acta med. Scandinav. 139, 122 (1950)

7. COTTIER, H. Experimenteller Beitrag zur Frage der
hypersplenischen Pancytopenien
Acta haematologica
Basel 7, 8 (1952)
8. CROSBY, W.H. Is Hypersplenism a Dead Issue
Blodd 20, 94 (1962)
9. DAMASHEK, W. Hypersplenism. Bull.
New York Acad. Med. 31, 113 (1955)
10. FISCHER, J. Hypersplenismus
Internist, 4, 176 (1971)
11. FRESEN, O., KRETSCHMER, H. Beziehungen zwischen
Milz und Hämopoese
Z. ges. exp. Med. 154, 36 - 59
Springer - Verlag (1971)
12. GOSTOMZYK, I.G., FEESER, C., RUHENSTROTH - BAUER, G.
Humorale Stimulierung der Ausschwemmung von
Granulozyten aus dem Knochenmark durch
die Milz
Klinische Wochenschrift 42, 5 (1964)
13. HEILMEYER, L. Physiologische Beziehungen zwischen
Milz und Knochenmark
Klinische Wochenschrift, 29, 30 (1955)
14. HITTMAYER, A. Die Physiologie und Pathologie der Milz
Urban & Schwarzenberg
München - Berlin - Wien (1969)

15. HITTMAYER, A. Hyper- und Dyssplenismus
Die Milz
Berlin - Heidelberg - New York
Springer - Verlag (1970)
16. HUEPER, W.C. Experimental Studies in Cardiovascular
Pathology IV. Methylcellulose, Atheromatosis
and Thesauriosis
Arch. Path. 33, 1 (1942)
17. JAEGER, K.H., MITTENZWEI, H. Erzeugung einer Spleno-
megalie bei Kälbern
Klinische Wochenschrift 36, 9 (1958)
18. LENNERT, K.A. und MONDORF, W. Zur Ätiologie der
Wundheilungsstörung und vermehrten In-
fektanfälligkeit nach Splenektomie
Die Milz
Berlin - Heidelberg - New York
Springer - Verlag, 386 (1970)
19. LENNERT, K.A., HARMS, D. Die Milz, The Spleen
Berlin - Heidelberg - New York (1970)
20. MICHL, H. in HEFTMANN, E. Hrsg.
Zusammenstellung flüchtiger Puffer
Chromatography Teil 1, 250 Reinhold
New York (1961)

21. MOTULSKY, A.G., CASSERD, F., GIBLETT, E.R.,
BROUN, G. O., FINCH, C. A. Anemia and the Spleen
New England J. Med. 259, 1164, 1215, (1958)
22. NORDØY, A. The Spleenless State in Man
The Spleen
Berlin - Heidelberg - New York (1970)
23. PALMER, I.G., EICHWALD, E.J., CARTWRIGTH, G.E.,
WINTROBE, M.M. The Experimental Production of
Splénomégalie, Anemia and Leukopenia
in Albino Rats
Blood 8, 72 (1953)
24. PÉREZ - TAMAYO, R., MORA, I., MONTFORT, I.
Humoral Factors in Experimental
Hypersplenism
Blood 15, 16 (1960)
25. PHARMACIA FINE CHEMICALS
Sephadex - Gelfiltration in Theorie
und Praxis (1969)
26. PRIBILLA, W. Über einige Funktionen der Milz
Internist, 8, 10 (1967)
27. RIEMANN, H. On the Toxicity of Hydroxylamine
Acta Pharmacologica & Toxicol. 6
285 (1950)

28. RUIZ, F. Evidence of a Myeloinhibitory Factor in
the Spleen
Blood 20, 793 (1962)
29. SACHS, L. Statistische Auswertungsmethoden
Springer - Verlag
Berlin - Heidelberg - New York (1971)
30. STEWART, C.C., INGRAM, M., A Method for Counting
Phytohemagglutinin - Stimulated Lymphocytes
Blood 29, 4 (1967)
31. STREICHER, H. J. Chirurgie der Milz
Berlin - Göttingen - Heidelberg
Springer - Verlag (1961)
32. WEINREICH Milz und Morbus Werlhof
Die Milz, 285
Berlin - Heidelberg - New York
Springer - Verlag 1970
33. WOLF, H.J., GERLICH, G.
Verh. deutsche Ges. inn. Med.
61. Kongress (1955)
34. ZISKA, P. Gelchromatographie von Tyrosin und
Tryptophanpeptiden an Sephadex G - 10 und
G - 15
Journal of Chromatography Vol. 60 (1971)

Herrn Prof. Dr. W. Stich, dem Direktor des
Institutes für Hämatologie, sei gedankt, in
seinem Institut promovieren zu können.

Für die weitreichende Unterstützung bei der
Durchführung der Arbeit bin ich Herrn Dr. M. Schmidt
zu Dank verpflichtet.

L E B E N S L A U F

Am 14. September 1947 wurde ich in Nürnberg als Sohn des Pastors Hermann Schürenberg und seiner Ehefrau Elfriede als zweites von vier Kindern geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1952 - 1956 in Nürnberg. Anschließend trat ich in das Hum. Melanchthon - Gymnasium in Nürnberg ein, bis ich 1967 das Abitur erlangte.

Im selben Jahr begann ich an der Friedrich - Alexander - Universität in Erlangen mit dem Studium der Human - Medizin.

Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich 1968 in Erlangen. Nach drei Semestern an der Universität in Erlangen setzte ich das Medizinstudium an der Ludwig- Maximilians - Universität in München fort, wo ich 1970 die ärztliche Vorprüfung ablegte.

Das medizinische Staatsexamen wurde am 20. 12. 1973 bestanden.

Die medizinische Doktorprüfung erfolgte am 22. 1. 1974 .

Seit Dezember 1970 bin ich verheiratet.

München, im Januar 1974

